Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. E. Bock

ÜBER DIE BESTIMMUNG DER GLUCOKINASEAKTIVITÄTEN IN MENSCHLICHEN LEBERPUNKTATEN MIT BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DES DIABETES MELLITUS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Dieter Sinn
aus Kiel
1968

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. E. Bock

ÜBER DIE BESTIMMUNG DER GLUCOKINASEAKTIVITÄTEN IN MENSCHLICHEN LEBERPUNKTATEN MIT BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DES DIABETES MELLITUS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Dieter Sinn
aus Kiel
1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. W. Graumann

1. Berichterstatter: Professor Dr. v. Oldershausen

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. E. Bock

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG 1

II. METHODIK DER GLUCOKINASE-BESTIMMUNG 3

III. ERGEBNISSE 9

Versuchsreihe I

a) Nichtdiabetiker 9

b) Diabetiker 10

Versuchsreihe II

a) Nichtdiabetiker 11

b) Diabetiker 12

Versuchsreihe III

a) Nichtdiabetiker 13

b) Diabetiker 14

Versuchsreihe IV

a) Nichtdiabetiker 14

b) Diabetiker 15

IV. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE 16

1. Vergleich der Ergebnisse der methodisch verschiedenen Versuchsreihen 16

2. Das Verhalten der Glucokinase-Aktivitäten bei Diabetikern und Nichtdiabetikern 18

V. ZUSAMMENFASSUNG 20

VI. LITERATURVERZEICHNIS 22

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547601_0113

I. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Bereits 1845 erkannte BERNARD, daß die Leber einen Einfluß auf den Kohlenhydratstoffwechsel ausübt. An kohlenhydratfrei ernährten Hunden untersuchte er Lebervenen- und Pfortaderblut und stellte dabei fest, daß die Lebervenen Zucker enthielten, die Pfortader dagegen keinen meßbaren Zuckergehalt aufwies. BERNARD schloß daraus, daß der Leber eine zuckerbildende Funktion zukommt. 1857 wurde von BERNARD das Glykogen entdeckt. MERING und MINKOWSKI gelang es 1889, künstlich einen Diabetes mellitus am Tier durch Pankreasexstirpation zu erzeugen. BANTING und BEST extrahierten 1921 aus dem Pankreas von Versuchstieren das Insulin. Die Zusammenhänge zwischen Pankreas und Leber in bezug auf den Kohlenhydratstoffwechsel waren seitdem Gegenstand vieler Forschungsarbeiten. Großes Interesse galt dem Angriffspunkt des Insulins in der Leber. Dabei hat die erst vor wenigen Jahren festgestellte Einwirkung des Insulins auf die Neubildung der Glucokinase in der Leber besonderes Interesse gewonnen.

Dieses Ferment wurde 1950 von CORI postuliert, weil die Glucosephosphorylierungskapazität der Leber unter Annahme einer Einwirkung von Hexokinase allein für eine normale Glykogensynthese in der Leber nicht ausgereicht hätte. Die Glucokinase steuert den ersten begrenzenden Schritt in der Glykolyse und Glykogensynthese der Leber, indem sie Glucose in Glucose-6-Phosphat umwandelt. SOLS und Mitarbeitern gelang es 1963, die Glucokinase von der Hexokinase durch Ammoniumsulfatfraktionierung zu trennen. Im Gegensatz zur Hexokinase ist die Glucokinase eine Phosphorylase mit einer spezifisch auf die Glucose beschränkten Wirkung. Die Glucokinase hat jedoch eine viel geringere Affinität zur Glucose als die Hexokinase. Der Km-Wert der Glucokinase liegt bei 10 bis 40 mMol Glucose-Konzentration, derjenige der Hexokinase dagegen bei 0,01 mMol. Aufgrund der unterschiedlichen Affinität der Hexokinase und Glucokinase zu Glucose können beide Fermente im gleichen Homogenat gemessen werden.

Die Glucokinase besitzt ein Molekulargewicht von 55 300 ± 1600 und eine optimale Wirkung bei einem pH von 7,5 - 8,0. Die Halbwertszeit der Glucokinase beträgt nach SALAS, VINUELA und SOLS (1963) am alloxandiabetischen Ratten 14 Stunden, nach WALKER und RAO (1963, 1964) 48 Stunden.

Nach WALKER und HOLLAND (1965) besitzt die foetale Leber nur Hexokinase. Die Glucokinase erscheint um den 16. Lebenstag und erreicht 10 - 12 Tage später ihre volle Aktivität.

In Hirn, Herz und Niere soll nur eine Hexokinase, dagegen keine Glucokinaseaktivität bestehen. Nach BACHELARD (1967) befindet sich aber auch im Hirn Glucokinase, allerdings in geringerer Konzentration als in der Leber. Nach MORRISON (1967) befindet sich die Glucokinase überwiegend in den Leberparenchymzellen, während in den Gallengangszellen fast nur Hexokinase und kaum Glucokinase zu finden ist.

TAKEDA, INOHUE, HONJO, TANIOKA und DAIKUHARA (1967) haben die Glucokinase-Aktivität in der normalen Rattenleber mit 11,0 ± 2,0 µMol/mg/min bestimmt. In der Leber diabetischer Ratten wurden von den gleichen Autoren 3,1 ± 1,2 µMol/mg Protein/min gemessen.

WALKER und RAO (1964) fanden bei nichtdiabetischen Ratten eine Glucokinase-Aktivität von 1,20 µMol phosphorylierte Glucose/min/g Leberfrischgewicht bei männlichen Ratten über 185 g Körpergewicht, von 1,28 bei männlichen Ratten mit niedrigerem Körpergewicht und von 1,33 bei weiblichen Ratten mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 227 g. Bei männlichen Ratten, die seit 2 Wochen einen Alloxandiabetes hatten, wurde eine Glucokinase-Aktivität von 0,19 ± 0,14 gemessen. Unter einer Insulintherapie stieg die Glucokinase-Aktivität nach 24 Stunden auf 0,39 und nach 14 Tagen auf 2,92 µMol phosphorylierte Glucose/min/g Leber an.

MORRISON (1967) untersuchte menschliche Leberparenchymzellen und fand eine Glucokinase-Aktivität von O, 53 µMol/g Lebertrockengewicht/min. Die Vergleichswerte an der Rattenleber lagen bei 1, 6 µMol/g Lebertrockengewicht/min. Menschliche Gallengangszellen wiesen eine Aktivität von O, 12 ± O, O2 µMol/g auf, während Gallengangszellen der Ratte keine meßbaren Glucokinase-Aktivitäten zeigten.

Die Untersuchungen von SHARMA, MANJESHWAR und WEINHOUSE (1963) an Rattenlebern ergaben ebenfalls signifikant höhere Glucokinase-Aktivitäten bei nichtdiabetischen Ratten gegenüber Ratten mit Alloxandiabetes. Bei gesunden Ratten wurde eine mittlere Glucokinase-Aktivität von 1, 23 U/g Leberfeuchtgewicht und bei diabetischen Ratten von O, 21 U/g bestimmt.

Während die bisherigen Untersuchungen vorwiegend an Rattenlebern durchgeführt wurden, beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Frage, ob die Glucokinase auch in der menschlichen Leber vorkommt und eine erniedrigte Aktivität bei Diabetikern aufweist. Dabei werden verschiedene Methoden der Glucokinasebestimmung miteinander verglichen und auf die Empfindlichkeit der Bestimmungsmethode an menschlichen Leberpunktaten hin untersucht.

II. UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND METHODIK DER GLUCOKINASEBESTIMMUNG

Die Aktivitäten an Glucokinase wurden in 31 Leberpunktaten von Diabetikern und 67 Leberpunktaten von Nichtdiabetikern bestimmt. Alle Punktate wurden durch Leberblindpunktion mit einer Menghininadel nach einer dreitägigen kohlenhydratreichen Vorperiode (200 g KH/die) gewonnen. Bei Diabetikern wurde auf die abendliche Gabe von Insulin oder oralen Antidiabetika am Vortag der Durchführung der Leberpunktion verzichtet. Das Feuchtgewicht der Leberpunktate schwankte zwischen

20 und 40 mg. Alle Punktate wurden unmittelbar nach der Leberpunktion in einem Gemisch von 3 ml 50 %-igem TRAP-Puffer (PH 7,5) und 50 % Ringer-Lösung homogenisiert, davon 84 Leberpunktate mittels eines Ultra-Turrax (4 x 15 sec bei einer Drehzahl von 24.000 U/min) und 14 Leberpunktate unter Anwendung eines Teflonpotter-Homogenisators (2 Minuten bei 2.000 U/min). Während des Homogenisierens befanden sich die Röhrchen mit den Leberpunktaten in einem Eiswasserbad.

In den mit dem Ultra-Turrax gewonnenen Homogenaten wurden Bestimmungen der Glucokinaseaktivität

1. in TRAP-Puffer PH 7,5 ,
2. in TRAP-Puffer PH 8,4 ,
3. in Glycylglycin-Puffer PH 7,0

vorgenommen. Das Homogenat wurde im Test 1 und 2 in einer Kühlzentrifuge bei + 4°C 30 Minuten lang bei 15.000 U/min zentrifugiert. In dem klaren Überstand wurde die Glucokinase-Aktivität mit der Glucose-6-Phosphatdehydrogenasereaktion im optischen Test nach WARBURG und CHRISTIAN bestimmt:

Hauptreaktion:

$$\text{a) Glucose + ATP} \xrightarrow[(Mg^{++})]{\text{Hexokinase + Glucokinase}} \text{Glucose-6-Phosphat + ADP}$$

Indikatorreaktion:

$$\text{b) Glucose-6-Phosphat + NADP} \xrightarrow{\text{Glucose-6-Phosphatdehydrogenase}} \text{6-Phosphogluconat + NADP } H_2$$

Versuchsreihe 1:

Ansatz A:

1 ml TRAP PH 7,5
2×10^{-5} Mol m/2 $MgCl_2$
5×10^{-7} Mol TPNox
$5,6 \times 10^{-6}$ Mol Glucose
0,5 ml Cytolysat

Start mit $1,2 \times 10^{-5}$ Mol ATP

In diesem Ansatz wurde die Hexokinase-Aktivität, in einem zweiten Ansatz die sogenannte "Gesamthexokinaseaktivität" bestimmt, die sich aus Hexokinase- und Glucokinase-Aktivität zusammensetzt. Der zweite Ansatz ist der gleiche, nur wird anstatt 5×10^{-6} Mol Glucose 1×10^{-4} Mol Glucose in den Ansatz gegeben.

Ansatz B:

1 ml TRAP PH 7,5
2×10^{-5} Mol m/2 $MgCl_2$
5×10^{-7} Mol TPNox
1×10^{-4} Mol Glucose
0,5 ml Cytolysat

Start mit $1,2 \times 10^{-5}$ Mol ATP

Das in dem Test verwendete ATP wurde zu 250 mg ad 2 ml Aqua bidest. gelöst und mit 1 normaler Natronlauge bis zur Neutralfarbe von Merck-Indikatorpapier neutralisiert. Dann wurde die Molarität des ATP wie folgt bestimmt:

1 ml TRAP PH 7,5
0,010 ml m/2 $MgCl_2$
0,065 ml 3 PG (5×10^{-6} Mol)
0,010 ml PGK (Kristallin)
0,010 ml $DPNH_2$ (3×10^{-7} Mol)
0,010 ml GAPDH

Start mit 0,02 ml ATP (1 : 10 Verd. mit TRAP PH 7,5)

Sowohl die Austestung der ATP-Molarität als auch die Hexokinase- und Glucokinasebestimmungen wurden mit Hilfe eines Eppendorf-Photometers bei 25° C mit einem Filter λ = 366 mμ durchgeführt.

An dem zentrifugierten Homogenat wurden Eiweißdoppelbestimmungen nach einer von BÜCHER angegebenen Methode vorgenommen. Dabei wurde 1 ml des 1 : 10 mit Aqua bidest. verdünnten, zentrifugierten Cytolysates in eine Küvette mit 2 ml einer Lösung aus Ammoniumsulfat und Trichloressigsäure gegeben und 20 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde mit einem Filter von 546 mμ die Extinktion gemessen und nach Abzug des Leerwertes die Proteinkonzentration in mg pro ml Cytolysat mit Hilfe einer Eichkurve ermittelt.

Alle Austestungen wurden in 3 ml Glas-Küvetten mit 10 mm Schichtdicke (d) durchgeführt. Die Hexokinase- und Glucokinaseansätze blieben 20 Minuten bei Zimmertemperatur stehen, dann wurde ATP zugesetzt und die Extinktionsänderung über 30 Minuten gemessen. Aus den mittleren 10 Minuten der Extinktionskurve wurden Δ E/min bestimmt. Mit Hilfe folgender Formel wurde dann die Umsatzgeschwindigkeit in Internationalen Einheiten (U) pro ml bzw. pro g Protein errechnet:

Formel 1:
$$U/ml = \frac{\Delta\ E/min \times Ansatzvolumen}{\varepsilon\ TPNH_2 + d + Testvolumen\ (0,5\ ml)}$$

Formel 2:
$$\frac{U/ml\ Testvolumen \times 1000}{mg\ Prot./ml\ Cytolysat} = U/g\ Prot.$$

Mit Hilfe dieser Versuchsanordnung wurden 18 Fälle untersucht.

Versuchsreihe II:

24 Punktate wurden mit der gleichen Versuchsanordnung, nur mit dem Zusatz von 1 ml TRAP pH 8,4 in dem Testansatz anstelle von 1 ml TRAP pH 7,5, untersucht.

Die Glucokinaseaktivität wurde aus der Differenz der Aktivitäten errechnet, die bei 100 mMol Glucosekonzentration und bei 0,5 mMol Glucosekonzentration erhalten wurden. Die Glucokinase-Aktivität ergab sich aus der Differenz der "Gesamthexokinase-" und Hexokinase-Aktivitäten.

Versuchsreihe III:

Die Glucokinase-Aktivität wurde in Leberpunktaten von 21 Patienten nach einer von DIPIETRO et al. (1963) angegebenen Methode bestimmt.

Testansatz nach DIPIETRO et al.:

Küvette A: Gewebeleerwert (50 mMol Glucose)
Küvette B: Gesamthexokinase (100 mMol Glucose)
Küvette C: Hexokinase (0,5 mMol Glucose)

Glycylglycinpuffer (pH 7) 0,7248 ml		
Küvette B	TPNox	(0,75 mMol)
	$MgCl_2$	(0,5 mMol)
	ATP	(3 mMol)
	G-6PDH	(0,2 I.E.)
	Glucose	(100 mMol)

Glycylglycinpuffer (pH 7) 0,8074 ml		
Küvette C	TPNox	(0,75 mMol)
	$MgCl_2$	(0,5 mMol)
	ATP	(3 mMol)
	G-6-PDH	(0,2 I.E.)
	Glucose	(0,50 mMol)

Gestartet wurde in beiden Tests mit 0,5 ml Enzymextrakt aus dem zentrifugierten Überstand des Leberhomogenates. Homogenisiert wird mit dem Ultra-Turrax 4 x 15 Sekunden bei Höchstdrehzahl wie oben

angegeben. Zentrifugiert wird in einer Kühlzentrifuge bei 4°C und 100 000 g 40 Minuten lang.

Den Leerwert (Küvette A) benötigt man zur Bestimmung der Glucokinase nicht. Das Δ E/min wird an einem Eppendorf-Photometer mit einem λ = 366 mμ Filter abgelesen. Die Messung wird 10 - 15 Minuten nach dem Start vorgenommen. Der Thermostat des Photometers ist auf 25°C eingestellt. Die Aktivität in U/g Prot. wird nach der Formel

Formel 3: $$\frac{\Delta \text{ E/min} \times K1 \times 100}{\Delta \text{ E Prot.} \times \varepsilon \times K2} = \text{U/g Prot.}$$

berechnet. Dabei geht die bei der Eiweißmessung im Homogenat nach BÜCHER erhaltene Extinktion als E Prot. in die Formel ein. Die Eiweißbestimmungen nach Biuret wurden an Rattenleberhomogenaten mit der von BÜCHER angegebenen Methode verglichen. Dabei ergaben sich durchweg höhere Eiweißwerte mit Biuret, die etwa doppelt so hoch lagen.

Versuchsreihe IV:

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Leberpunktate mit einem Teflon-Potter homogenisiert. Es wurde der Testansatz nach DIPIETRO et al. benutzt. Der Leerwert von Küvette A wurde nicht gemessen. Es wurde die Differenz der Aktivitäten in Küvette B und C gemessen, die der Glucokinase-Aktivität entspricht. Die Testbedingungen waren die gleichen wie unter dem von DIPIETRO et al. angegebenen Test mit Ausnahme des Homogenisierungsmediums. Anstatt des von DIPIETRO et al. (1963) angegebenen Gemisches aus KCl, EDTA, $MgCl_2$ und 2-Mercaptoäthanol wurde eine Mischung aus TRAP pH 7,5 Puffer und Ringerlösung (50 : 50) verwendet.

III. ERGEBNISSE

Versuchsreihe I:

a) Nichtdiabetiker:

Die Meßergebnisse der Glucokinaseaktivität schwanken zwischen O, 755 und O U/g Prot. Der Mittelwert und dessen Standardabweichung betrugen O, 256 $\pm$ O, 216 U/g Protein. Die Aktivitäten weisen um eine Zehnerpotenz niedrigere Werte als die nach DIPIETRO et al. (1963) gemessenen auf. Keine Glucokinase-Aktivität wurde in einem von 18 Fällen gemessen. Es handelte sich hierbei um einen Patienten mit Morbus Boeck.

Tab. 1: Glucokinaseaktivitäten von 18 Nichtdiabetikern der Versuchsreihe I.

Zahl	Patient	Diagnose	Glucokinase U/g Protein
1	Ne.	Fettleber	0,064
2	Hi.	Leberzirrhose	0,275
3	Th.	Tuberkulose	0,600
4	Le.	Morbus Boeck	0,340
5	Si.	Pyelonephritis	0,050
6	Ho.	Morbus Boeck	0,000
7	Ke.	Hepatitis	0,466
8	Ch.	Pyelonephritis	0,755
9	Sch.	Hämochromatose	0,094
10	Wu.	Tuberkulose	0,140
11	Mü.	Blutspender	0,170
12	Se.	Chol. Hepatose	0,078
13	Sch.	Alkoholische Leberzirrhose	0,515
14	Po.	Morbus Boeck	0,187
15	Sch.	Mening. -Tbc	0,098
16	Ec.	Hepatitis	0,210
17	Se.	Hyperlipämie	0,119
18	Se.	Fettleber	0,440
			$\bar{x}$ = 0,256 $\pm$ 0,216 U/g Prot.

b) Diabetiker:

Die bei Diabetikern gemessenen Aktivitäten der Glucokinase liegen deutlich unter denen der Nichtdiabetiker. Die Streubreite liegt hier zwischen O U/g Prot. und O,39 U/g Prot. Sie ist hier geringer als bei Nichtdiabetikern. Der Mittelwert und dessen Standardabweichung betragen O,179 ± O,1493 U/g Protein. Bei 3 von 11 Fällen wurde keine Glucokinase-Aktivität im Leberpunktat gemessen. Davon stand ein Patient unter oraler Antidiabetikatherapie mit 1 g Rastinon pro Tag, die beiden anderen Kranken waren nur diätetisch eingestellt.

Tab. 2: Glucokinase-Aktivitäten bei 11 Diabetikern der Versuchsreihe I.

Zahl	Patient	Therapie	Glucokinase U/g Protein
1	Zi.	44 E Insulin	O,30
2	We.	32 E Insulin	O,11
3	Mü.	32 E Insulin	O,24
4	Je.	2O E Insulin	O,39
5	Ku.	1 g Rastinon	O,OO
6	Ka.	1 g Rastinon	O,OO
7	St.	1 g Rastinon	O,39
8	Ne.	Diät	O,O9
9	Kl.	Diät	O,26
1O	Ha.	Diät	O,19
11	Th.	Diät	O,OO

$\bar{x}$ = O,179 ± O,149 U/g Prot.

Versuchsreihe II:

a) Nichtdiabetiker:

Die Glucokinase-Aktivitäten von Nichtdiabetikern liegen unter Verwendung eines TRAP-Puffers mit pH 8,4 im Ansatz höher als bei den Nichtdiabetikern, die mit TRAP-Puffer pH 7,5 bestimmt wurden. Die Streubreite ist größer als bei den Messungen mit TRAP-Puffer pH 7,5, indem die Werte zwischen O und 1,89 U/g Prot. schwanken. Der Mittelwert und dessen Standardabweichung betragen O,527 ± O,527 U/g Prot. In 3 von 24 Fällen wurde keine Glucokinase-Aktivität im Leberhomogenat gemessen. Davon war ein Patient an einer Pneumonie, ein weiterer an einer Meningitis und der dritte an einer Virushepatitis erkrankt.

Tab. 3: Glucokinase-Aktivität bei 24 Nichtdiabetikern der Versuchsreihe II.

Zahl	Patient	Diagnose	Glucokinase U/g Prot.
1	Lo.	Eryth. nod. rheumat.	0,34
2	Sa.	Chol. Hepatose	0,23
3	Ba.	Tuberkulose	0,84
4	Wa.	Leberdystr.	0,000
5	Se.	Meningitis	0,175
6	Nr.	path. Rast. -Test	0,29
7	Ke.	Hepatitis	1,50
8	Br.	Morbus Pfeiffer	0,41
9	Sf.	Chr. Hepatitis	1,54
10	Bi.	Zustand n. Hepatitis	0,00
11	Dr.	Meningitis	1,89
12	Ri.	Meningitis	0,00
13	Kl.	Pneumonie	0,00
14	Se.	Typhus	0,375
15	We.	Meningitis	0,715
16	Wa.	Tuberkulose	0,625
17	We.	Hepatitis	0,420
18	Me.	Fettleber	0,230
19	St.	vegetat. Dystonie	0,400
20	St.	Cholostase	0,070
21	Se.	Fettleber	0,335
22	Ja.	Hepatitis	1,29
23	Kr.	Myotonia cong.	0,42
24	St.	Fettleber	0,563

b) Diabetiker:

Die Glucokinase-Aktivitäten von Diabetikern, die mit TRAP-Puffer pH 8,4 gemessen wurden, sind niedriger als diejenigen, welche unter Verwendung von TRAP-Puffer pH 7,5 gemessen wurden. Die Streubreite ist mit O bis O,35O U/g Protein kleiner als bei Nichtdiabetikern der gleichen Versuchsreihe und etwas geringer als die der Glucokinase-Aktivitäten, welche mit TRAP-Puffer pH 7,5 bestimmt wurden. Der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwertes betragen O,235 $\pm$ O,322 U/g Protein. 4 von lO Patienten wiesen keine Glucokinase-Aktivitäten im Leberhomogenat auf. Davon waren 3 Patienten ohne Medikamente. Der vierte Patient bekam 56 E Insulin/Tag.

Tab. 4: Glucokinase-Aktivitäten bei lO Diabetikern der Versuchsreihe II.

Zahl	Patient	Therapie	Glucokinase U/g Protein
1	Mo.	6O E Insulin	O,170
2	Be.	1 g Rastinon	O,100
3	Se.	Diät	1,000
4	Se.	Diät	O,55
5	Je.	Diät	O,000
6	Mo.	Diät	O,000
7	St.	Diät	O,350
8	Rö.	56 E Insulin	O,000
9	Ha.	36 E Insulin	O,150
lO	He.	44 E Insulin	O,026
		$\bar{x}$ = O,235 $\pm$ O,322 U/g Prot.	

Versuchsreihe III:

a) Nichtdiabetiker:

Die nach der Methode von DIPIETRO et al. untersuchten Leberpunktate ergaben um das fünf- bis zwanzigfach höhere Glucokinase-Aktivitäten als die Versuchsreihen I und II. Von 15 Fällen wurde bei einem Kranken mit Bilharziose keine Glucokinase-Aktivität gemessen. Die Werte schwankten zwischen O und 7,45 U/g Prot.
Der Mittelwert und die Streuung des Mittelwertes von 15 untersuchten Leberpunktaten nichtdiabetischer Probanden lagen bei 2,55 $\pm$ 2,18 U/g Protein.

Tab. 5: Glucokinase-Aktivitäten bei 15 Nichtdiabetikern der Versuchsreihe III.

Zahl	Patient	Diagnose	Glucokinase U/g Prot.
1	So.	Enteritis	1,25
2	He.	Hepatitis	1,12
3	Mu.	Hepatitis	2,19
4	S. U.	Hepatitis	3,30
5	Gi.	Amyloidose	7,45
6	Ni.	tox. Lebersch.	6,30
7	Kl.	Meningitis	1,45
8	Str.	Bilharziose	0,96
9	No.	Arthrose	2,70
10	Ey.	Pankreatitis	3,83
11	Bi.	Meningitis	0,72
12	Mi.	Bilharziose	0,00
13	Ve.	Lup. vulg.	0,45
14	Ar.	Endocarditis	4,55
15	Pr.	Retikulose	2,05
			$\bar{x}$ = 2,55 $\pm$ 2,18 U/g Prot.

b) Diabetiker:

Die mit der von DIPIETRO et al. angegebenen Methode gemessenen Glucokinase-Aktivitäten sind um das zwanzigfache höher als diejenigen, welche in den Ansätzen mit TRAP-Puffer ermittelt wurden. Die Werte schwankten zwischen 1, 21 und 4, 45 U/g Protein. Der Mittelwert und die Standardabweichung lagen bei 2, 5116 $\pm$ 1, O969 U/g Protein. Es trat kein Fall ohne Glucokinase-Aktivität auf.

Tab. 6: Glucokinase-Aktivitäten bei 6 Diabetikern der Versuchsreihe III.

Zahl	Patient	Therapie	Glucokinase U/g Prot.
1	Be	Diät	1,79
2	Sl.	72 E Insulin/die	2,5
3	Re.	1 g Rastinon/die	1,21
4	Bo.	Diät	2,42
5	Dö.	1 g Rastinon/die	2,70
6	Li	4O E Insulin/die	4,45
		$\bar{x}$ = 2,51 $\pm$ 1,10 U/g Prot.	

Versuchsreihe IV:

a) Nichtdiabetiker:

Die mit einem Teflon-Potter homogenisierten Leberpunktate von Nichtdiabetikern streuen in ihren Glucokinase-Aktivitäten nicht so stark wie die vorhergehenden Versuchsreihen I - III. Die Höhe der gemessenen Werte gleicht mit einem Mittelwert von 2, 87 $\pm$ 1, OO U/g Prot. etwa derjenigen der Versuchsreihe III.

Tab. 7: Glucokinase-Aktivitäten bei 10 Nichtdiabetikern der Versuchsreihe IV.

Zahl	Patient	Diagnose	Glucokinase U/g Prot.
1	Lu.	Asthma	3,90
2	Rö.	Meningitis	2,05
3	Rä.	unbek. Infektion	4,15
4	Mö.	Hepatitis	1,90
5	Sa.	Malaria	1,60
6	Mo.	Fettleber	2,80
7	Ke.	Herzinfarkt	1,85
8	Sch.	Fettleber	4,16
9	Ba.	Fettleber	3,10
10	Schu.	Cholelithiasis	3,18
			$\bar{x}$ = 2,87 ± 1,00 U/g Prot.

b) Diabetiker:

In dieser Versuchsreihe wurden die höchsten Glucokinase-Aktivitäten aller Versuchsreihen gemessen. Die Werte streuen zwischen 1,1 und 6 U/g Protein. Der Mittelwert und seine Standardabweichung betragen 3,11 ± 2,06 U/g Protein.

Tab. 8: Glucokinase-Aktivitäten bei 4 Diabetikern der Versuchsreihe IV.

Zahl	Patient	Therapie	Glucokinase U/g Prot.
1	Bö.	28 E Insulin	1,10
2	Ma.	1 g Rastinon	2,74
3	Pf.	Diät	2,60
4	Bur.	44 E Insulin	6,00
			$\bar{x}$ = 3,11 ± 2,06 U/g Prot.

IV. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

1. Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Versuchsreihen mit unterschiedlicher Methodik.

a) Versuchsreihe I:

Die Glucokinase-Aktivitäten dieser Versuchsreihe liegen weit unter den von anderen Autoren an Ratten gemessenen Aktivitäten.

Eigene Untersuchungen an Rattenlebern unter den in der Versuchsreihe I angegebenen Versuchsbedingungen ergaben ebenfalls niedrigere Glucokinase-Aktivitäten, als sie mit den folgenden Methoden II - IV erhalten wurden. Eine Erklärung für diese niedrigen Aktivitätswerte kann das von OTTO (1966) angegebene pH-Optimum für die Glucokinase sein. Dieses liegt mit 7,5 - 8,0 etwas höher als das pH (7,5) in dem Testansatz der Versuchsreihe I. Da die Homogenate in der Versuchsreihe I nur mit 15.000 U/min zentrifugiert wurden, kann auch noch eine Glucose-6-Phosphataseaktivität eine Rolle spielen, die der Glucokinase entgegenwirkt. Die Glucose-6-Phosphatase befindet sich in der Mikrosomenfraktion des Homogenates und läßt sich bei 15.000 U/min nicht quantitativ abzentrifugieren. Vergleichende Untersuchungen an Rattenlebern ergaben bei einer Zentrifugation von 40.000 U/min höhere Glucokinase-Aktivitäten als Messungen an denselben Homogenaten, welche bei 15.000 U/min zentrifugiert wurden. Es liegt nahe, dafür die Anwesenheit von nicht völlig abzentrifugierter Glucose-6-Phosphatase verantwortlich zu machen (DIPIETRO et al., 1962).

b) Versuchsreihe II:

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen liegen höher als diejenigen der Versuchsreihe I, aber noch immer unter den Werten, die von anderen Autoren (DIPIETRO et al., 1962,, SHARMA, MANJESHWAR, WEINHOUSE, 1963) und nach eigenen Untersuchungen an Rattenlebern gemessen wurden.

Daß die Werte der Versuchsreihe II höher als die der Versuchsreihe I liegen, ist vermutlich auf den höheren pH-Wert des verwendeten TRAP-Puffers zurückzuführen, da alle anderen Versuchsbedingungen gleich geblieben sind.

Nach OTTO (1966) gibt es ein lysosomales oder mitochondriales Protein, welches die Glucokinaseaktivität senken soll. Dieser Vorgang könnte bei denjenigen Homogenaten von Bedeutung sein, die mit dem Ultra-Turrax gewonnen wurden, da hierbei die Mitochondrien zerstört und dabei mitochondriale Proteine freigesetzt werden sollen. Da aber sowohl bei der Versuchsreihe I und II als auch bei der Versuchsreihe III Ultra-Turraxhomogenate angewandt wurden, ist eine hemmende Einwirkung eines mitochondrialen Proteins auf die Glucokinase-Aktivitäten wahrscheinlich nicht für die Ergebnisse dieser Versuchsreihen verantwortlich zu machen.

c) Versuchsreihe III:

Die wesentlich höheren Glucokinase-Aktivitäten dieser Untersuchungen gegenüber den vorangegangenen sind sehr wahrscheinlich auf die bei 100. 000 g abzentrifugierte Glucose-6-Phosphatase zurückzuführen (DiPIETRO et al., 1962). Die Ergebnisse liegen etwa in der gleichen Größenordnung wie die an Ratten gemessenen Aktivitäten.

d) Versuchsreihe IV:

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe unterscheiden sich unwesentlich von denen der Versuchsreihe III. Die Glucokinase-Aktivitäten liegen etwas höher. An Homogenaten aus Rattenlebern vorgenommene Vergleichsuntersuchungen wiesen zwei- bis fünffach höhere Glucokinase-Aktivitäten in den mit Hilfe des Potter-Homogenisators gewonnenen Homogenaten auf gegenüber denjenigen, die mit Hilfe des Ultra-Turrax hergestellt wurden.

Tab. 9: Mittelwerte ($\bar{x}$), Standardabweichung ($s_{\bar{x}}$) und Signifikanz der Mittelwertdifferenzen im t-Test der Glucokinase-Aktivitäten in Leberhomogenaten von Nichtdiabetikern und Diabetikern in den Versuchsreihen I - IV.

Versuchs-reihe	n_1	$\bar{x}_1$	n_2	$\bar{x}_2$	$\bar{x}_1-\bar{x}_2$	t	p
I	18	0,256 ($\bar{s}=\pm$0,051)	11	0,179 ($\bar{s}=\pm$0,045)	0,077	1,0313	<0,40
II	24	0,527 ($\bar{s}=\pm$0,107)	10	0,235 ($\bar{s}=\pm$0,102)	0,293	1,6267	<0,20
III	15	2,555 ($\bar{s}=\pm$0,562)	6	2,512 ($\bar{s}=\pm$0,448)	0,043	0,0455	<0,98
IV	10	2,869 ($\bar{s}=\pm$0,312)	4	3,110 ($\bar{s}=\pm$1,032)	0,241	0,3038	<0,80

2. Das Verhalten der Glucokinase-Aktivitäten bei Diabetikern und Nichtdiabetikern:

Nach vorangegangenen Untersuchungen von SALAS, VINUELA und SOLS (1963) sowie SHARMA, MANJESHWAR und WEINHOUSE (1963) an Rattenlebern war zu erwarten, daß die Glucokinase-Aktivitäten auch in der menschlichen Leber bei einer diabetischen Stoffwechsellage vermindert sind. Die bei alloxandiabetischen Ratten stark herabgesetzte Glucokinase-Aktivität steigt 10 Stunden nach Insulininjektion steil an und erreicht nach 24 Stunden die Norm (SHARMA et al., 1963). Die Untersuchungen an menschlichen Leberpunktaten ließen sich jedoch nicht unter den gleichen Bedingungen durchführen wie an Ratten. Doch wurde eine gewisse Standardisierung der Versuchsbedingungen dadurch erzielt, daß vor den Leberpunktionen eine

Standarddiät mit 200 g KH gegeben und vor Durchführung der Leberpunktion am Vorabend kein Insulin bzw. am Vortage keine oralen Antidiabetica verabreicht wurden.

In den Versuchsreihen I - IV läßt sich keine signifikante Erniedrigung der Glucokinase-Aktivitäten bei Diabetikern feststellen. Obwohl die Glucokinase-Aktivitäten bei Diabetikern der Versuchsreihe I um etwa 30 %, der Versuchsreihe II um etwa 80 % unter den Werten der Nichtdiabetiker lagen, wurde unter Annahme einer t-Verteilung nach STUDENT keine sichere Signifikanz für die Differenz der Mittelwerte festgestellt (vgl. Tabelle 9), so daß die bisherigen Untersuchungen an humanen Leberpunktaten unter den angeführten Bedingungen im Gegensatz zu den Beobachtungen beim Alloxandiabetes der Ratte keine sicheren Unterschiede der Glucokinase-Aktivitäten in der Leber von Stoffwechselgesunden und Diabetikern ergaben. Wie weit hierfür Art und Umfang einer vorhandenen Leberzellschädigung, die bei zahlreichen Kranken in beiden Kollektiven vorlag, verantwortlich zu machen sind, kann bisher nicht sicher entschieden werden, zumal anderweitige Befunde bei Leberkranken auf eine teils vorhandene diabetische Stoffwechselstörung hinweisen (CREUTZFELDT, 1962; v. OLDERSHAUSEN et al., 1964). Bekanntlich ist die Glucokinase-Aktivität in der Rattenleber vom Vorhandensein von Insulin (SHARMA et al., 1963; SALAS et al., 1963) abhängig. Dieses induziert die Neubildung von Glucokinase in der Leber. Da man mit BERSON (1965) Diabetiker in zwei Hauptgruppen mit erhöhtem und erniedrigtem Insulinspiegel einteilen kann, könnte ein erhöhter Insulinspiegel im Blut auch zu erhöhten Glucokinase-Aktivitäten bei Diabetikern führen, was möglicherweise die stark streuenden Glucokinase-Aktivitäten in den verschiedenen Versuchsreihen erklärt.

Weiterhin beeinflußt auch die Aufnahme von Kohlenhydraten den Insulinspiegel und damit die Glucokinase-Aktivität der Leber. Deshalb wurde eine gleichmäßige Kohlenhydratzufuhr drei Tage vor Ausführung der Leberpunktion angestrebt. Immer ließ sich dies nicht durchführen, so daß auch hierdurch eine Streuung der Glucokinase-Aktivitäten bedingt

sein kann. Nachdem CRANE und SOLS (1960) bei alten Ratten doppelt so hohe Glucokinase-Aktivitäten in der Leber gefunden haben wie in jüngeren Tieren, ist es möglich, daß eine Altersabhängigkeit der Glucokinase-Aktivitäten in der Leber auch beim Menschen besteht. Da die Glucokinase nicht direkt, sondern über das entstandene Glucose-6-Phosphat im gekoppelten enzymatischen Test nach WARBURG und CHRISTIAN gemessen wird, können alle Fermente, die den Glucose-6-Phosphat-Spiegel in dem Testansatz beeinflussen, eine Verfälschung der Glucokinase-Aktivität bewirken. In Frage kommen die Phosphoglucomutase, die einen vermehrten Anfall von Glucose-6-Phosphat mit sich bringt, und die Phosphoglucoseisomerase, die Glucose-6-Phosphat in Fructose-6-Phosphat umwandelt.

In den hier vorgenommenen Untersuchungen konnten wegen der durch die Größe der Leberpunktate beschränkten Substratmenge die genannten Enzyme nicht bestimmt werden, so daß Art und Ausmaß der angegebenen Fehlermöglichkeiten nicht eindeutig zu klären waren.

V. ZUSAMMENFASSUNG

An Leberpunktaten von 31 Diabetikern und 67 Nichtdiabetikern wurden Untersuchungen der Glucokinase-Aktivitäten durchgeführt. Die Glucokinasebestimmung wurde sowohl nach einer von WARBURG und CHRISTIAN angegebenen Methode unter verschiedenen pH-Bedingungen als auch nach einer von DiPIETRO, WEINHOUSE und SHARMA ausgearbeiteten Methode vorgenommen. Die verschiedentlich und auch in eigenen Kontrolluntersuchungen beobachtete Verminderung der Glucokinase-Aktivitäten in der Rattenleber bei Alloxandiabetes ließ sich in humanen Leberpunktaten bei Kranken mit verschieden stark ausgeprägtem Diabetes mellitus nicht nachweisen. Im Gegensatz zu den in der Leber von Ratten bestimmten Glucokinase-Aktivitäten streuen die Glucokinase-

aktivitäten in menschlichen Leberpunktaten so stark, daß statistisch gesicherte Unterschiede der Glucokinase-Aktivitäten bei Diabetikern und Nichtdiabetikern nicht festzustellen sind. Hierfür möglicherweise verantwortliche Faktoren werden abschließend erörtert.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ABRAHAM, S., BORREBAEK, B., CHAIKOFF, J. L.: Effect of dietary carbohydrate on glucokinase and mannokinase activities of various tissues.

   Journal of Nutricion 83, 273-288 (1964)

2. BACHELARD, H. S.: Glucose-phosphorylating enzyme with high km in human brain.

   Nature, 215, 959-960 (1967)

3. BERNARD, Ch.: Du suc gastrique et son role dans la nutricion.

   Diss. Paris (1843)

4. BERNARD, Ch., BARRESVIL, C. L.: De la présence du sucre dans le foie.

   Compt. rend. Acad. sc. (Paris), 27, 514 (1848)

5. BERSON, H. S., YALOW, R. S.: Some controversies in diabetes research.

   Diabetes 14, 549-573 (1965)

6. CAHILL, G. F., ASHMORE, J., SCOTT, EARLE, A., ZOTTU, S.: Glucose penetration into liver.

   Am. J. Phys. 192, 491 - 496 (1958)

7. COLOWICK, S. P., CORI, G. T., SLEIN, M. W.: The effect of adrenal cortex and anterior pituitary extracts and insulin on the hexokinasereaction.

   J. Biol. Chem. 169, 583-596 (1947)

8. CREUTZFELDT, W.: Beziehungen zwischen Leber und Zuckerkrankheit

   4e Congrès de la Fédération internationale du Diabète, S. 50-62 (1961)

9. DiPIETRO, D. L., WEINHOUSE, S., SHARMA, C.: Studies on glucose phosphorylation in rat liver.

   Biochemistry 1, 455-457 (1947)

10. DiPIETRO, D. L., WEINHOUSE, S.: Hepatic glucokinase in the fed, fasted and alloxandiabetic rat.

    J. Biol. Chem. 235, 2542-2545 (1960)

11. FREDERICHS, H., BALL, E.G.: Studies on the metabolism of adipose tissue inhibition by phlorizin and phloretin of the insulin stimulated uptake of glucose.

Biochemistry 3, 981-985 (1964)

12. BANTING, G.: Further clinical experience with insulin.

Brit. med. Journal, Juni 1923, S. 8-11

13. FIGUEROA, E., NIEMEYER, H., PFEIFER, A.: Incorporation of C_{14}-Glucose into glycogen by whole homogenate of liver.

Nature 193, 382-383 (1962)

14. LAURIS, V., CAHILL, A.M.u. G.F.: Hepatic glucosephosphotransferases, variations among species.

Diabetes 15, 475-479 (1966)

15. LEVINE, R.: Analysis of the actions of the hormonal antagonists of Insulin.

Diabetes 13, 362-365 (1964)

16. LONG, C.: Studies involving enzymatic phosphorylation.
1. The hexokinase activity of rattissues.

B.J. 50, 407-415 (1952)

17. v. MERING, J., MINKOWSKI, O.: Diabetes mellitus nach Pankreasextirpation.

Arch. exper. Path. Pharmak. Leipzig 26, 371 (1890)

18. MORRISON, G.: Hexokinase and glucokinase activities in bileduct epithelial cells and hepatic cells from normal rat and human livers.

Arch. Bioch. 122, 569-573 (1967)

19. v. OLDERSHAUSEN, H.-F., KOLB, K.H., MAIBAUER, D.: Zur Frage des hepatogenen Diabetes.

Gastroenterologica; Suppl. ad Vol. 104, 157-165 (1965)

20. OTTO, K.: Anreicherung und Eigenschaften der Glucokinase der Rattenleber.

Hoppe-Seylers Zschr. physiol. Chem. 346, 42-54 (1966)

21. PRICE, W.H., CORI, C.F., COLOWICK, S.P.: The effect of anterior pituitary extract and of insulin on the hexokinase reaction.

J. biol. Chem. 160, 633-634 (1945)

22. RENOLD, A. E., HASTINGS, A. B., NESBETT, F. B., ASHMORE, J.: Studies on carbohydrate metabolism in rat liver slices; sequence of events after insulin administration.

J. biol. Chem. 213, 135-146 (1955)

23. SHARMA, C., MANJESHWAR, R., WEINHOUSE, S.: Effects of diet and insulin on glucose adenosine triphosphate phosphotransferases of rat liver.

J. biol. Chem. 238, 3840-3845 (1963)

24. SALAS, M., VINUELA, E., SOLS, A.: Insulin dependant synthesis of liver glucokinase in the rat.

J. biol. Chem. 238, 3535-3538 (1963)

25. SHARMA, C., MANJESHWAR, R., WEINHOUSE, S.: Hormonal and dietary regulation of hepatic glucokinase.

Adv. Enzyme Regulation 2, 189-200 (1964)

26. SHARMA, C., MANJESHWAR, R., WEINHOUSE, S.: Effects of diet and insulin on hepatic glucokinase of the rat.

Diabetes 12, 359 (1963)

27. STEINER, D., KING, J.: Induced synthesis of hepatic uridine diphosphate glucose glycogen glycosyltransferase after administration of insulin to alloxan-diabetic rats.

J. biol. Chem. 239, 1292-1298 (1964)

28. SOLS, A., SALAS, A., VINUELA, E.: Induced biosynthesis of liver glucokinase.

Adv. Enzyme Regulation 2, 177-188 (1964)

29. SOLS, A., VINUELA, E., SALAS, M.: Glucokinase and hexokinase in liver in relation to glycogensynthesis.

J. biol. Chem. 238, PC, 1175 (1963)

30. SOLS, A., VINUELA, E., SALAS, M.: Glucokinase of rabbit liver.

J. biol. Chem. 240, 1014-1018 (1965)

31. SLEIN, M. W., CORI, G. T., CORI, C. F.: A comparative study of hexokinase from yeast and animal tissues.

J. biol. Chem. 186, 763-780 (1950)

32. TAKEDA, J., INOHUE, H., TANIOKA, H., HONYO, K., DAIKUHARA, J.: Dietary response of various key enzymes related to glucosemetabolism in normal and diabetic rat liver.

Bioch. et Biophys. Acta 136, 214-222 (1967)

33. VESTER, J.W.,: The direct effect of insulin on rat hepatic glucokinase: progress report.

Diabetes 14, 468 (1965)

34. VESTER, J.W., REINO, M.L.: Hepatic glucokinase and direct effect of insulin.

Science 142, 590-591 (1963)

35. WALKER, D.G.: Development of hepatic enzymes for the phosphorylation of glucose and fructose.

Advances in Enzyme Reg. 3, 163-184 (1965)

36. WALKER, D.G.: On the presence of two soluble glucose-phosphorylating enzymes in adult liver and the development of one of these after birth.

Bioch. et Biophys. Acta 77, 209-226 (1963)

37. WALKER, D.G., RAO, S.: The effect of glucose analogues on the hepatic glucose phosphorylating enzyme.

Bioch. et Biophys. Acta 77, 662-665 (1963)

38. WALKER, D.G., RAO, S.: The role of hepatic glucokinase in the phosphorylation of glucose by rat liver.

Biochemical Journal 90, 360-368 (1964)

39. WALKER, D.G., HOLLAND, R.: The development of hepatic glucokinase in neonatal rat.

Bioch. J. 97, 845-854 (1965)

40. WALKER, D.G., PARRY, M.J.: "Glucokinase" I. Liver. In: Colowick, Kaplan "Methods in Enzymology". Vol. 9, 381-388 (1966)

41. WEBER, G., SINGHAL, R., L., STAMM, N.B., LEA, M.A., FISHER, E.A.: Synchronous behavior pattern of key glycolytic enzymes : glucokinase, phosphofructokinase and pyruvatkinase.

Advances in Enzyme Regulation 4, 59-80 (1966)

42. WEBER, G., LEA, M.A., HIRD, H.J., STAMM, N.B.: Regulation of gluconeogenesis and glycolysis: Studies of mechanismus controlling enzyme activity.

Advances in Enzyme Regulation 5, 257-295 (1967)

43. WEINHOUSE, S., CHRISTOFALO, V., SHARMA, C., MORRIS, H.P.: Some properties of glucokinase in normal and neoplastic liver.

Advances in Enzyme Regulation I, 363-371 (1963)

44. WOLF, H.P.: Insulin und Intermediärstoffwechsel.

Dtsch. med. Wschr. 90, 835-840 (1965)

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. H. E. Bock
von der Medizinischen Universitätsklinik für die Möglichkeit, in Tübingen die Untersuchungen durchzuführen.

Besonders danke ich Herrn Professor Dr. v. Oldershausen für die Überlassung des Themas und seinen Rat bei der Ausarbeitung der Dissertation.

Herrn Professor Dr. G.W. Löhr danke ich für wesentliche Anregungen zu dieser Arbeit und sein stets förderndes Interesse.

Lebenslauf

Am 14. September 1940 wurde ich, Dieter Sinn, in Kiel als Sohn des Assistenzarztes Dr. med. Hanns-Dietrich Sinn und seiner Ehefrau Marianne geb. Jacobi geboren.
Nach Besuch der Volksschule in Malente-Gremsmühlen in Schleswig-Holstein und des Gymnasiums für Jungen in Eutin absolvierte ich 1962 das Abitur.
Anschließend Medizinstudium in Erlangen, Hamburg und Tübingen mit Vorphysikum 1963 und Physikum 1964 in Erlangen. Im Februar 1968 bestand ich an der Universität Tübingen das medizinische Staatsexamen.

Druck:

DISSERTATIONSDRUCKSTELLE
der Ernst-Reuter-Gesellschaft
der Förderer und Freunde
der Freien Universität Berlin e. V.
Pächter: Franz Augustin
1 Berlin 33, Garystr. 45